PROGENIE MOLECULAR

CE

Papitype®

Progenie molecular
Artes y Oficios 37. Valencia 46021. España. Tel. 902 91 05 05 Fax 902 91 05 06
www.progenie-molecular.com

PAPI v.1, PASC v.1, PAID v.1

1 Descripción del método

Papitype es un sistema de reactivos que permite la detección y el tipado de los papilomavirus humanos (VPH) en muestras clínicas. El sistema *Papitype* consiste en:

1) **Extracción del ADN vírico**: se realiza mediante digestión de las proteínas celulares y víricas mediante incubación con proteinasa K en un tampón adecuado.

2) **Amplificación**: se realiza mediante un protocolo que utiliza unos oligonucleótidos genéricos que permiten obtener un producto del ORF L1 común a todos los tipos de papilomavirus. La longitud de este producto es 450 pares de bases (pb) aproximadamente dependiendo del tipo de VPH. La mezcla de amplificación permite la amplificación de un control interno (CI) de 590 pb. Este producto debe aparecer en todas las muestras y permite descartar los falsos negativos. Debido a su tamaño y a la ausencia de dianas de restricción no interfiere en la interpretación de los resultados.

3) **Análisis de restricción del producto de amplificación**: se realiza mediante 2 digestiones simultáneas utilizando las enzimas EnzI y EnzII. Cada digestión es analizada electroforéticamente en un gel de agarosa.

4) **Identificación del patrón de restricción**: se realiza por comparación con los patrones teóricos incluídos en la tabla adjunta. El análisis permite la identificación del tipo de papilomavirus de forma inequívoca.

2 Especificaciones

- **Sensibilidad**: 1000 UI/µL. La sensibilidad analítica se ha demostrado mediante dilución límite utilizando el VPH 16 (1st WHO International Standard for Human Papillomavirus (HPV) Type 16 DNA. NIBSC code: 06/202). Se ha demostrado esta sensibilidad en ensayos replicados con una reproducibilidad superior al 95%. La sensibilidad puede variar dependiendo del tipo vírico analizado.
- **Especificidad**: Virus del papiloma humano.

3 Componentes

El sistema *Papitype* incluye los siguientes componentes. Todos los reactivos están listos para su uso sin añadir ni reconstituir ningún componente. Dependiendo de la referencia utilizada, los reactivos incluidos son los siguientes:

- *Papitype* PAPI: todos los componentes indicados en la tabla.
- *Papitype* PASC: Proteinasa K, Solución de digestión 2X, Amplimix VPH, Taq polimerasa y Control positivo ADN VPH.
- *Papitype* PAID: EnzI, EnzII y Marcador peso molecular.

Componente	Viales	Volumen	Conservación
Proteinasa K	2	1000 µL	-15 / -25 ºC
Solución digestión 2X	2	1000 µL	-15 / -25 ºC
AmpliMix VPH	2	900 µL	-15 / -25 ºC
Enz I (10 U/µL)	1	42 µL	-15 / -25 ºC
Enz II (5 U/µL)	1	82 µL	-15 / -25 ºC
Taq polimerasa	1	10 µL	-15 / -25 ºC
Control positivo ADN VPH	1	50 µL	-15 / -25 ºC
Marcador peso molecular	1	26 µL	-15 / -25 ºC

* Después del primer uso, mantener la proteinasa K y la solución de digestión a 2-8 ºC.
* Proteinasa K: Irritante y Sensibilizante. Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel. Posibilidad de sensibilización por inhalación y en contacto con la piel. No respirar los vapores. Evítese el contacto con la piel. En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. Xn, R36/37/38-42/43, S23-24-26-36/37
* Reactivos necesarios no suministrados: Agua destilada, Cloruro sódico 0,9 %, agarosa, tampón TBE, bromuro de etidio, tampón de carga de electroforesis 5X.

4 Advertencias y precauciones

- Todos los componentes del kit deben mantenerse en frío mientras se están manipulando.
- Después de añadir el ADN, minimizar el tiempo necesario para iniciar el programa de amplificación.
- Descongelar y congelar repetidas veces los reactivos puede disminuir la sensibilidad del kit.
- Usar guantes desechables.
- Usar pipetas calibradas y puntas de pipeta con filtro.
- Los ensayos deben llevarse a cabo por personal cualificado y siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.
- No usar el kit después de la fecha de caducidad.
- Uso para diagnóstico *in vitro*.

5 Procedimiento

Dependiendo de la referencia utilizada, proceder según se indica:
- *Papitype* PAPI: procedimiento completo.
- *Papitype* PASC: seguir el procedimiento hasta el punto 5.4.
- *Papitype* PAID: seguir el procedimiento desde el punto 5.5 en adelante.

5.1 Preparación de muestras cervicales, uretrales y anales tomadas con escobillones sin medio

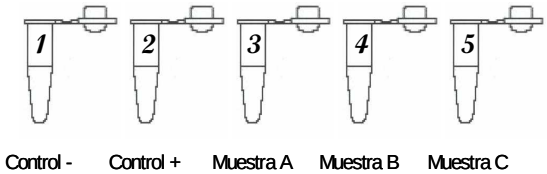
1 Añadir 1,5 mL de cloruro sódico 0,9 % al tubo que contiene la torunda.
2 Agitar en el vortex durante 1 min.
3 Decantar el sobrenadante en un tubo de 1,5 mL autoclavado.
4 Centrifugar durante 5 min a 13000 rpm.
5 Descartar el sobrenadante con la pipeta, con cuidado de no arrastrar el pellet de células.

5.2 Extracción del ADN vírico

1 Añadir 50 µL de Solución de Digestión 2X y 50 µL de Proteinasa K a la preparación de células.
2 Incubar a 55 ºC durante 2 h.
3 Incubar a 95 ºC durante 10 min para inactivar la Proteinasa K.
4 Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min.
5 Conservar a -15/-25 ºC hasta su uso en la reacción de amplificación.

5.3 Preparación de la reacción de amplificación

1 Preparar y rotular los tubos de 0,2 mL necesarios para la amplificación de muestras y controles. Se recomienda seguir el siguiente esquema:



2 Descongelar la **AmpliMix VPH** y el ADN de muestras y controles.
3 En un tubo de 1,5 mL, tomar el volumen de **AmpliMix VPH** necesario para todas las reacciones (por cada muestra 44,8 µL).
4 Añadir el volumen necesario de Taq polimerasa (0,2 µL por reacción). Mezclar fuertemente.
5 Pipetear 45 µL de la mezcla anterior en cada tubo de amplificación. Descartar el volumen restante.
6 Añadir 5 µL del sobrenadante de cada extracción de ADN vírico al tubo correspondiente.
7 Colocar los tubos en el termociclador y someterlos al siguiente perfil térmico:

Tiempo	Temperatura	Ciclos
4:00	94 ºC	1
0:30	94 ºC	
0:45	52 ºC	40
0:30	72 ºC	
4:00	72 ºC	1
	4 ºC	

5.4 Detección de los productos de amplificación

1 Tomar una alicuota de 10 µL del producto de amplificación de muestras y controles.
2 Añadir 2,5 µL de tampón de carga de electroforesis 5X
3 Cargar en un gel de agarosa al 2% y realizar la electroforesis.

* Este punto es opcional si se va a proceder al tipado.

5.5 Tipado de VPHs

1 Preparar 2 alicuotas de 20 µL con el producto de amplificación.
2 Añadir a uno de los tubos 1 µL de EnzI y al otro 2 µL de EnzII.
3 Incubar a 37 ºC durante 1 hora.
4 Añadir 3 µL de tampón de carga de electroforesis 5X a cada tubo.
5 Cargar el volumen de las 2 digestiones en pocillos adyacentes de un gel de agarosa al 3% y realizar la electroforesis.

* Se recomienda cargar las digestiones junto al marcador de peso molecular.

6 Interpretación de los resultados

6.1 Detección de papilomavirus

Interpretar los resultados según la siguiente tabla:

Resultado		Interpretación
banda 590 pb	banda 450 pb	
+	-	NO SE DETECTA VPH
+	+	POSITIVO VPH
-	+	POSITIVO VPH
-	-	NO VALORABLE (prueba no válida)

6.2 Identificación del tipo vírico

1 Anotar el tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos en la digestión con EnzI y Enz II (excepto la banda del control interno).

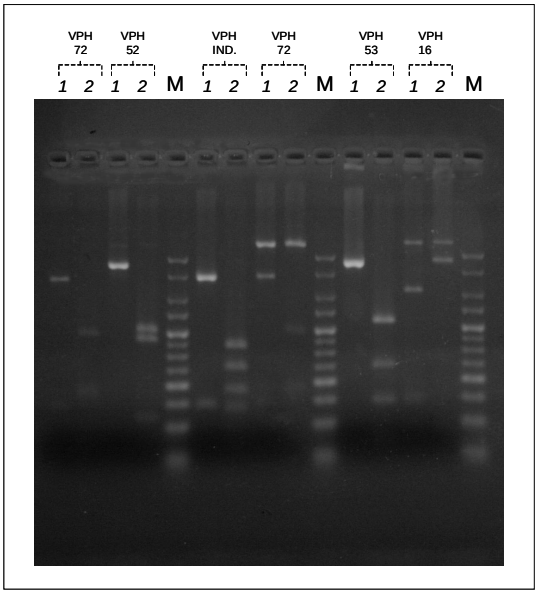
2 Comprobar que la suma de los tamaños de los fragmentos en ambos casos es 450 pb aprox. (en caso de una muestra portadora de 2 VPHs la suma debería ser 900 pb aprox.).

3 Interpretar el resultado según la siguiente tabla:

Resultado	Interpretación
A) NO se observan bandas de restriccción de VPHs. SI se observa la banda del C.I. (590 pb)	NO SE DETECTA VPH
B) Se observan bandas de restricción de VPHs*. Distinguir entre una de las siguientes opciones:	
B1) Se identifican los patrones de restricción de EnzI y EnzII con algún VPH	POSITIVO VPH X
B2) Se identifican los patrones de restricción de EnzI y EnzII con varios VPHs	POSITIVO VPHs X y Z
B3) No se identifican los patrones de restricción con los de ningún VPH	POSITIVO VPH INDETERMINADO
C) NO se observan bandas de restricción de VPHs. NO se observa la banda del C.I.**	NO VALORABLE (prueba no válida)

* En las muestras con alta carga viral el producto de amplificación del control interno podría no aparecer por competición con el de VPH.
* Las bandas de menor tamaño no suelen ser visibles en el gel, excepto en las muestras con alta carga viral.
* Algunas muestras son portadoras de dos o más virus. En este caso los patrones de restricción de ambos virus se superponen dificultando su identificación.
** Algunas muestras clínicas presentan inhibidores de la reacción de amplificación que impiden la obtención del producto del control interno (banda de 592 pb). En este caso se recomienda repetir todo el proceso utilizando el sistema de purificación de ADN QIAamp® DNA Blood Mini Kit de Qiagen®. Si se obtuviera el mismo resultado habria que informar resultado NO VALORABLE y solicitar una nueva muestra.

7 Ejemplo de resultado



Resultados obtenidos con diferentes muestras clínicas.

8 Control de calidad

Se recomienda que se lleven a cabo controles positivos y negativos cada vez que se realice un análisis.
Cada lote del kit *Papitype* ha sido validado tras pasar un exhaustivo control de calidad.

* Este manual sirve para las referencias:
- *Papitype* PAPI: kit completo (detección e identificación de VPH)
- *Papitype* PASC: kit parcial (sólo detección de VPH)
- *Papitype* PAID: kit parcial (sólo identificación de VPH).

Fecha de publicación: Abril 2012.